

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Studijní obor: Zdravotnický laborant



Mgr. Zuzana Hrochová

Validace bioanalytických metod - legislativa v rámci EU a
USA

(rešeršní práce)

Validation of bioanalytical methods – EU and USA
legislations

(review)

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce, doc. PharmDr. Ludmile Matysové Ph. D., za její odborné vedení, pomoc, trpělivost a cenné připomínky k mé práci.

Mé poděkování dále patří mé rodině a mým přátelům za všestrannou pomoc a psychickou podporu při studiu.

Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na porovnání legislativních požadavků a následně na porovnání konkrétních nároků na validaci bioanalytických metod vyplývajících z požadavku Food and drug administration (FDA) v USA a European medicines agency (EMA) v Evropské unii. Bylo zjištěno, že obě agentury vycházejí z jiného právního základu. FDA je vládou agenturou, která je součástí federálního systému. Vydává vlastní zákony a jednotlivá nařízení, která mají právní závaznost. Oproti tomu EMA je nevládní agentura a slouží pouze jako poradní orgán Evropské unie. Obě tyto agentury vydaly své návody tzv. guidy. FDA vydala Guidance for industry – bioanalytical method validation a EMA vydala Guideline on bioanalytical method validation. Oba návody mají pouze charakter doporučení a nemají právní závaznost.

Oba návody obsahují podobné informace. Obě agentury se liší v uspořádání kapitol a důrazu na jednotlivé problémy, ale základní parametry, které diskutují a které mají oba návody společné, jsou selektivita, carry over, LLOQ a nastavení kalibrační křivky, správnost a přesnost metody, stabilita systému a cross validace.

Zásadní rozdíly mezi oběma návody nejsou, liší se pouze v kritériích, které uznávají pro jednotlivé parametry, jediný větší rozdíl panuje ve vymezení pojmu cross validace a v jeho chápání jednotlivými agenturami. FDA Guidance není tak podrobný jako návod od EMA, ale tento rozdíl je dán tím, že právní základ ze kterého vychází obě agentury je rozdílný a FDA používá tento Guidance jako návod, jak uplatňovat konkrétní legislativní požadavky v praxi. EMA Guideline je právně nezávazný návod jak by měla být validace provedena, aby byly splněny všechny podmínky, tak aby mohl být výsledkem považován za validní a aby byl v souladu se správnou laboratorní praxí. Nemá právní závaznost, a proto záleží na každé laboratoři, jestli se podle těchto doporučení bude řídit či nikoli.

Abstract

This thesis was aimed of the legal requirements and the comparison of specific requirements for validation of bioanalytical methods resulting from the requirement administration Food and Drug Administration (FDA) in the US and European medicines Agency (EMA) in the European Union. It was found that both agencies based on a different legal basis. FDA is part of the federal system. Publishes its own laws and the regulations which have binding legal force . In contrast, the EMA is a non governmental agency and only serves as an advisory committee of the European Union. Both agencies have issued their instruction - Guideline. The FDA issued a Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation and EMA issued Guideline on bioanalytical method validation. Both manuals are only as recommendations and They haven't legal liability.

Both manuals contain similar informations. Both agencies differ from the arrangement of the chapters and an emphasis on individual issues, but the basic parameters that are discussed and They are the same selectivity, carry over, LLOQ and setting of the calibration curve, accuracy and precision of the method, system suitability, and cross validation.

There were no fundamental differences between the two instructions, they only differ from the criteria that recognize the individual parameters. Major difference exists only in the definition of cross validation and in his understanding of individual agencies. FDA Guidance is not as detailed as an instruction from the EMA, but this difference is due to the fact that the legal basis on which it is based is different. FDA use this Guidance only like advise for laboratories how to apply specific legislative requirements in practice. EMA guideline is not have binding legal force and the guideline for the validation should be performed in order to fulfill all the conditions. The validation should be in accordance with guideline could be considered valid and that, in accordance with good laboratory practice. EMA guideline is not legally binding and therefore depends on each lab, if these recommendations will follow or not.

Klíčová slova

Validace

Bioanalytické metody

Evropská léková agentura (EMA)

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA)

Keywords

Validation

Bioanalytical methods

European medicines agency (EMA)

Food and drug administration (FDA)

Seznam použitých zkratk

AM	aritmetický průměr
CAT	Výbor pro moderní terapie
COMP	Výbor pro léčivé přípravky pro vzácná onemocnění
CVMP	Výbor pro léčivé přípravky pro veterinární použití
EMA	European medicines agency
EU	Evropská unie
FDA	Food and Drug administration
GCP	správná klinická praxe
GLP (SLP)	správná laboratorní praxe
HMPC	Výbor pro rostlinné léčivé přípravky
CHMP	Výbor pro léčivé přípravky pro humánní použití
IS	interní standard
LLOQ	spodní limit meze kvantifikace
MF	matricový faktor
PRAC	Výbor pro posuzování rizik v rámci farmakovigilance
QCs	quality control samples – vzorky pro kontrolu kvality
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SOP	standardní operační postupy
ULOQ	horní limit meze kvantifikace
US	Spojené státy americké

Obsah

1. Úvod	10
1.1. Cíl práce	10
2. Bioanalytické metody	10
3. Validace	12
3.1. Definice	12
3.2. Obecné validační parametry využívané v klinických laboratořích	12
3.2.1. Opakovatelnost, mezilehlá přesnost	13
3.2.2. Vychýlení metody (BIAS)	13
3.2.3. Porovnatelnost metody	13
3.2.4. Pracovní rozsah měření	14
3.2.5. Meze detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) [2]	14
3.2.6. Výťažnost metody [2]	14
3.2.7. Interference a analytická selektivita	15
3.3. Validace vs. Verifikace	15
4. Validace bioanalytických metod z pohledu European Medicines Agency	16
4.1. Historie EMA	16
4.2. Validační parametry dle EMA	18
4.2.1. Celková validace	18
4.2.1.1. Selektivita	19
4.2.1.2. Přenos	19
4.2.1.3. LLOQ	20
4.2.1.4. Kalibrační závislost	20
4.2.1.5. Správnost	20
4.2.1.6. Přesnost	21
4.2.1.7. Integrita ředění	21
4.2.1.8. Matricové efekty	22
4.2.1.9. Stabilita	22
4.2.2. Částečná validace	23
4.2.3. Cross validace	23
4.2.4. Analýza vlastních vzorků	23
4.2.5. Dokumentace	23

5.	Validace bioanalytických metod z pohledu Food and drug administration (FDA)	24
5.1.	Historie FDA	24
5.2.	Validační parametry dle FDA	26
5.2.1.	Selektivita	27
5.2.2.	Správnost, přesnost a výtěžnost	28
5.2.3.	Kalibrační křivka	29
5.2.4.	Citlivost	30
5.2.5.	Reprodukovatelnost	30
5.2.6.	Stabilita	30
6.	Srovnání validačních parametrů dle FDA Guidance a EMA Guideline	32
6.1.	Selektivita	33
6.2.	Carry over	34
6.3.	LLOQ a kalibrační křivka	34
6.4.	Správnost a přesnost metody	34
6.5.	Stabilita	34
6.6.	Cross validace	34
7.	Závěr	38
8.	Literatura	40

1. Úvod

1.1. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jak jsou nastaveny legislativní požadavky a jednotlivé validační parametry při validaci bioanalytických metod v USA a v Evropské unii. Toto hodnocení vycházelo hlavně z doporučení, které vydaly dvě nejvýznamnější agentury a to Food and drug administration v USA a European medicines agency v Evropské unii. Cílem této práce bylo prozkoumat validační požadavky jednotlivých agentur a tyto požadavky srovnat a zjistit jestli jsou shodné nebo rozdílné.

2. Bioanalytické metody

Jednoznačná definice pro bioanalytické metody neexistuje, ale ve většině literatury jsou definovány jako analytické metody, které se používají pro analýzu v biologickém materiálu jako je sérum, plasma, moč, sliny, tkáň atd.[5,6] Zjednodušeně by se dalo říci, že se jedná o klasické analytické metody, které byly upraveny tak, aby se daly použít při stanovení v biologické matrici. Bioanalytické metody pro stanovení analytu využívají specifických interakcí mezi molekulami. Mezi tyto interakce patří elektrostatické interakce, hydrofobní interakce, Van der Waalsovy síly a tvorba vodíkových můstků. Molekuly, které spolu reagují při tvorbě biospecifické interakci pracují na principu tzv. „zámku a klíče“ tzn. jedná se o specifickou reakci, kdy dojde ke vzniku komplexu pouze v případě, kdy se setkají dvě molekuly, které do sebe zapadnou a vytvoří prostorovou konformaci viz tabulka č.1. [1] Na rozdíl od kovalentních vazeb, u kterých je třeba energie dodat v případě, že je třeba tuto vazbu rozrušit, se u biospecifických interakcí vazba rozruší již při malé změně okolních podmínek např. změně pH nebo iontové síly roztoku a tím pádem není třeba žádnou energii dodávat. Díky těmto interakcím jsme schopni dosahovat nízkých detekčních limitů viz. Tabulka č. 2 a jsme schopni zajistit vysokou citlivost a specifitu pro jednotlivá stanovení. [1]

Rozdělit bioanalytické metody je možné stejně jako ty analytické, protože vychází ze stejných principů. Bioanalytické metody tedy využívají enzymové analytické metody, imunochemické metody, metody chromatografické, elektromigrační a dále

metody využívající vazbu ligandu. [5,6,8,9,17] U velké části metod se používá jako ligand radionuklid např. značený uhlík, vodík, iód nebo fosfor. Díky těmto značkám je reakce velmi specifická a umožňuje dosáhnout podstatně nižších detekčních limitů, než reakce bez značek viz tabulka č. 2 [1]

Tabulka č. 1 – vybrané biospecifické interakce [1]	
Interakce	K_a
(Strept-)Avidin-Biotin	10 ¹⁵
Protilátka-hapten	10 ⁵ - 10 ¹¹
Protilátka-imunogen	10 ⁵ - 10 ¹¹
Vazebná bílkovina-ligand	10 ⁵ - 10 ¹¹
Lektin- monosacharid	10 ³
Lektin- polysacharid	10 ⁶ - 10 ⁷
Enzym-substrát	10 ¹ - 10 ⁶

Tabulka č. 2 – přehled nejčastěji používaných značek [1]	
Značka	Přibližný detekční limit (mol)
¹⁴ C (β ⁻)	4 x 10 ⁻¹³
³ H (β ⁻)	10 ⁻¹⁵
¹²⁵ I (γ)	10 ⁻¹⁷
³² P (β ⁻)	3 x 10 ⁻¹⁸
¹³¹ I (β ⁻ , γ)	2 x 10 ⁻¹⁸
β-galaktosidasa	10 ⁻¹³
Luminol	10 ⁻¹⁷
Fluorescein	10 ⁻¹⁴

3. Validace

3.1. Definice

Validaci můžeme definovat z několika pohledů. Dle mezinárodního metrologického slovníku je validace definovaná jako ověření, že námi vybrané požadavky jsou vhodné pro námi zamýšlené použití.[3,13] Z pohledu managementu kvality je možné validaci metody definovat jako potvrzení, které bylo získáno pomocí objektivních důkazů.[4] Tyto důkazy by měly ukázat, že požadavky na specifické použití či aplikaci dané metody byly splněny. Jinak řečeno, úroveň měření, kterou poskytuje daná metoda je dostatečná, postupy měření korektní a mají řádně provedenou kalibraci. Objektivními důkazy jsou myšlena data získaná z plánovaných experimentů, údaje z výrobní dokumentace, z certifikačních procesů a z výzkumných laboratoří. Validaci provádějí výrobci diagnostika, kteří mohou na evropský trh uvádět pouze diagnostika, která jsou validována podle direktivy IVD 98/79 EC a dále je nutné, aby validační postupy splňovaly normu ČSN EN 13612 (2002). Konečnou odpovědnost za provedenou validaci mají již konkrétní laboratoře. Tyto laboratoře se musí řídit stejnou direktivou jako výrobci reagentů, ale dále musí sledovat i právní normy jednotlivých států a nařízení Evropské unie. Mimo uvedené normy jsou požadavky na hloubku a rozsah validace uvedeny v normě ISO 17025 a ISO 15189. Validace bioanalytických metod můžeme rozdělit na validaci již validované metody, validaci provedených modifikací již validované metody a validaci nové metody. [2]

3.2. Obecné validační parametry využívané v klinických laboratořích

Validace každé metody je jedinečná a závislá na celé řadě podmínek. Obecně lze ovšem charakterizovat několik základních parametrů, které lze charakterizovat u jakékoli metody. Těmito základními parametry jsou opakovatelnost metody, mezilehlá přesnost, vychýlení metody, porovnatelnost metody, pracovní rozsah měření, stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti dané metody, výtěžnost metody a v neposlední řadě interference a analytická selektivita dané metody. [2,5,6,10,12]

3.2.1. Opakovatelnost, mezilehlá přesnost

Opakovatelnost měření je dle mezinárodní metrologického slovníku definovaná jako těsnost shody mezi výsledky po sobě následujících měření stejné měřené veličiny provedených za stejných podmínek měření. Cílem opakovatelnosti je kvantifikovat náhodné chyby v průběhu měření. Měření se provádí jako série 20 měření dvou vzorků o dvou různých koncentracích. Z takto získaných dat se vypočítá směrodatná odchylka opakovatelnosti v sérii 20 vzorků a mezilehlá přesnost. Každý z obou vzorků je měřen buď v průběhu po sobě jdoucích 20 dní anebo v průběhu po sobě jdoucích 10 dní ve dvou sériích. Statisticky se tedy hodnotí průměr, směrodatná odchylka opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti a jejich variační koeficient. [2]

3.2.2. Vychýlení metody (BIAS)

Cílem je odhadnout systematické chyby vznikající při měření. Bias dokumentuje stav návaznosti měření v laboratoři. Bias se zjišťuje nejčastěji na základě porovnání získaných výsledků referenčních materiálů s výsledky získanými ostatními laboratořemi se stejným referenčním materiálem. Měří se deset opakování daného vzorku. Z takto získaných dat vypočítáme hodnotu aritmetického průměru (AM). Dále se vypočítá hodnota opakovatelnosti ve formě směrodatné odchylky (SD) a variačního koeficientu (CV). Dále se vypočítá vychýlení metody jako výtěžnost R [2, 13]

$$R = \frac{AM}{\mu} \quad \text{nebo jako} \quad R = 100 \cdot \frac{AM}{\mu} [\%]$$

μ - referenční hodnota analytu

3.2.3. Porovnatelnost metody

Cílem je vyhodnotit bias, typ systematické chyby a korelaci porovnáním se srovnávací metodou. Ideální srovnávací metodou je metoda s referenčním měřícím postupem. Porovnáváme mezi sebou výsledky získané s obou metod, které se následně vynesou do grafu, kdy na ose X jsou vyneseny hodnoty referenční metody.[2, 15]

3.2.4. Pracovní rozsah měření

Cílem určení pracovního rozsahu je zajistit rozsah měření pro konkrétní laboratoř. Tento rozsah určuje v jakém rozmezí, můžeme očekávat spolehlivé výsledky. Do dokumentace se zanese graf, který ukazuje vztah mezi teoretickou koncentrací vzorku a námi naměřenou průměrnou hodnotou. [2]

3.2.5. Meze detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) [2]

Mez detekce se stanovuje z hodnot po sobě jdoucích 10 měření blanku vzorku. Z těchto dat se vypočítá výběrová směrodatná odchylka SD_{BLANK} a vypočítá se LOD

$$\text{LOD} = 3 \cdot SD_{\text{BLANK}}$$

S pomocí SD_{BLANK} se vypočítá i hodnota meze stanovitelnosti

$$\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD}$$

3.2.6. Výtěžnost metody [2]

Výtěžnost nás může informovat o celé řadě věcí. U separačních metod je to informace o účinnosti izolačního postupu. [18] Dále poskytuje informace o selektivitě dané metody nebo nepřítomnosti systematické chyby měření. Výtěžnost se nejčastěji zjišťuje změřením dostupného referenčního materiálu. Pokud tato možnost neexistuje, je tato metoda nahrazena měřením s přidavkem známého množství analytu do nativního materiálu pacienta. Výtěžnost se v takovém případě vyhodnocuje podle následujícího vztahu:

$$K = (\text{koncentrace přidavku} \cdot \text{objem přidavku}) / (\text{objem přidavku} + \text{objem vzorku})$$

Dále se vypočtou průměry duplikátu měření vzorků A a B. Potom se vypočtou rozdíly mezi A a B a stanoví se průměr jejich duplikátů (D). Z těchto hodnot se pak vypočte výtěžnost jako poměr D/K. Výtěžnost v procentech je možno vyjádřit

$$R = 100 \cdot \frac{D}{K} [\%]$$

3.2.7. Interference a analytická selektivita

V běžných laboratořích je tato problematika omezena na problematiku matricových efektů. Testování se provádí stejně jako u testování výtěžnosti metody, akorát s tím rozdílem, že se místo analytu do nativního vzorku přidává interference. Objem přidaného interferentu musí být co nejmenší, aby nedošlo k naředění matrice. [2,14]

3.3. Validace vs. Verifikace

Verifikace je pojem, který velmi úzce souvisí s validací. Verifikací se rozumí, ověření tzn. poskytnutí objektivního důkazu, že daný parametr splňuje požadovaná kritéria. Verifikace se používá jako pojem v laboratořích pro postup, který ověřuje, že zaváděná, již validovaná, metoda poskytuje dokladovanou výkonnost. Jinými slovy dokazuje, že personál dané laboratoře pracuje správně a metoda je tím pádem vhodná k použití pro zamýšlený účel. U verifikace se také posuzují základní parametry jako u validace. Rozdíl v rozsahu parametrů je vidět v tabulce č. 3. [2]

Tabulka č. 3 - Výkonnostní parametry validace/verifikace analytického postupu	
Validace	Verifikace
Opakovatelnost	opakovatelnost
mezilehlá přesnost	mezilehlá přesnost
vychýlení (bias)	vychýlení (bias)
pracovní rozsah	pracovní rozsah
mez detekce a mez stanovitelnosti	
ostatní (matricové interference, srovnání s jinou metodou, srovnání pomocí výsledků EHK, robustnost, výtěžnost...)	

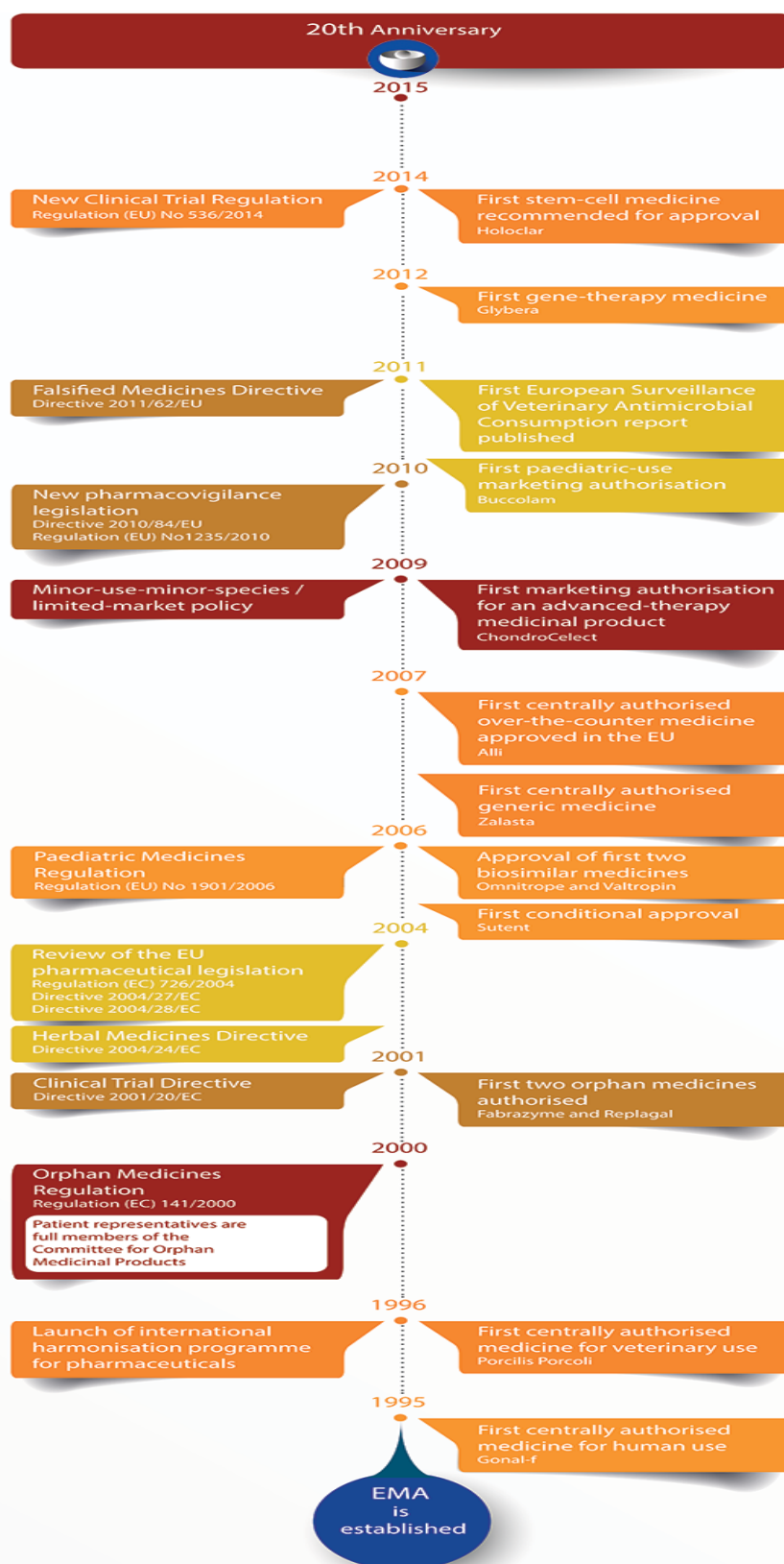
4. Validace bioanalytických metod z pohledu European Medicines Agency

4.1. Historie EMA

European medicines agency (EMA) je jak už název napovídá evropská agentura, celým názvem je to Evropská léková agentura, která byla založena v roce 1995 pod hlavičkou Evropské unie (EU) jako orgán, který měl za úkol sjednotit národní regulační úřady jednotlivých členských států. Tato agentura dohlíží na vědecké hodnocení, dohled a bezpečnost léků, léčivých přípravků a přípravků určených pro veterinární medicínu. Tato agentura se rozšiřovala společně s rozšiřováním legislativních požadavků Evropské unie. Oblasti, ve kterých se EMA angažuje, jsou vidět na obrázku č. 1. [19,20]

Po organizační stránce je EMA tvořena správní radou, ve vedení je výkonný ředitel a důležitou složkou jsou zaměstnanci agentury. Správní radu, která sídlí v Londýně, tvoří 36 lidí, kteří pracují ve veřejném zájmu a nezastupují žádnou firmu, vládu ani agenturu. Jsou zodpovědní za směřování a fungování celé agentury. Jsou zodpovědní za tvorbu ideových plánů a určení směru, kterým se bude celá agentura ubírat. V čele je výkonný ředitel, který je právně zodpovědný za celou agenturu a řeší provozní problémy a dále jsou zde zaměstnanci agentury, kteří svou prací podporují výkonného ředitele a svou prací naplňují cíle, které určila správní rada. Aby mohla EMA pokrýt celou řadu oblastí, jsou její zaměstnanci rozděleni do sedmi vědeckých výborů. Tyto výbory spolupracují s celou řadou odborníků. Tito odborníci pocházejí z členských zemí EU. Konkrétně se jedná o: [21]

- Výbor pro léčivé přípravky pro humánní použití (CHMP)
- Výbor pro posuzování rizik v rámci farmakovigilance (PRAC)
- Výbor pro léčivé přípravky pro veterinární použití (CVMP)
- Výbor pro léčivé přípravky pro vzácná onemocnění (COMP)
- Výbor pro rostlinné léčivé přípravky (HMPC)
- Výbor pro moderní terapie (CAT)
- Pediatrický výbor
- Pracovní skupiny a další skupiny



Obrázek č. 1 – historické mezníky EMA [19]

Z pohledu bioanalytických metod je nejvýznamnějším dokumentem Guidance on bioanalytical method validation. Tento dokument navazuje na základní principy v části I a II přílohy I směrnice 2001/83 ve znění pozdějších předpisů, a nařízení (ES) č. 726/2004. Validace bioanalytických metod a analýza studijních vzorků pro klinické studie u lidí by měly být provedeny podle zásad správné klinické praxe (GCP). Další pokyny pomoci, kterých budou v klinických laboratořích vyvíjet a používat systémy jakosti by měly být v souladu s příslušnými směrnice Evropské unie a národními předpisy jednotlivých členských států. [20]

4.2. Validační parametry dle EMA

Dle doporučení EMA jsou bioanalytické metody chápány jako metody pro stanovení koncentrace léčiva v biologické matrici, která byla získána ze zvířecích toxikokinetických studií nebo všech fází klinických studií. Tento doporučení obsahuje informace o validaci jak celkové tak částečné a dále rozlišuje mezi metodami, které jsou využity pro validaci. Obsahuje samostatné návody pro chromatografické metody a metody využívající vazbu ligandu. Metody s využitím biomarkeru nejsou součástí tohoto návodu. Z pohledu procesu validace je návod rozdělen do tří samostatných částí a to: [5]

- Celková validace bioanalytické metody
- Částečná validace bioanalytické metody
- Cross validace

V dalších částech je věnována pozornost analýze studovaných vzorků, ISR a metodám využívajících vazbu ligandu a reportování výsledků.

4.2.1. Celková validace

Hlavním úkolem celkové validace bioanalytické metody je stanovit koncentraci analytu ve specifické biologické matrici, kterou může být krev, sérum, plasma, moč či sliny. U biologických vzorků se často používají antikoagulační činidla. V případě, že tomu tak je, je třeba zahrnout antikoagulační činidla do procesu validace. Aby bylo možno metodu prohlásit za validní, je třeba projít a vyzkoušet několik základních parametrů. EMA návod stanovuje následující parametry, které je třeba sledovat. Jsou to

selektivita, LLOQ, kalibrační rozsah metody, přesnost, správnost, matricové efekty, stabilita analytu v biologické matrici, stability analytu a interního standartu v zásobním a pracovním roztoku, stability po extrakci z matrice a stability při skladování vzorku.

Pro ověřování správnosti výsledků a správnosti nastavení bioanalytické metody se často využívají referenční materiály. Tyto materiály se využívají jako kalibrační standardy, jako QC vzorky nebo vzorky pro kontrolu stability. Referenční materiály se mohou používat také jako interní standardy při chromatografických technikách. Referenční standardy jsou v několika možných dostupných formách. Vyskytují se jako tzv. compendial vzorky, což jsou vzorky ověřené a komerčně dostupné v nejvyšší kvalitě na úrovni evropského nebo amerického lékopisu. Další úrovní jsou komerčně dostupné standardy- ty mají také jasně danou čistotu a složení, ale slouží pro jiný účel než compendial standardy. Dále jsou zde standardy tzv. "doma vyrobené "nebo standardy vyrobené nekomerčními společnostmi např. syntéza standardu na universitě pro vědecké účely.

Pro metody využívající MS detekci se jako referenční standardy používají nejčastěji isotopově značené látky. Tyto standardy mají nejvyšší možnou čistotu a je garantováno, že nedochází k degradaci či změně izotopu. [5]

4.2.1.1. Selektivita

Selektivita bioanalytické metody je definovaná jako schopnost bioanalytické metody rozlišit a kvantifikovat analyt nebo IS od ostatních komponentů ve vzorku. Selektivita by měla být prokázána pomocí testování alespoň šesti různých vzorků odpovídajících svým složením blanku matrice. Tyto blanky jsou testovány na přítomnost interferujících látek. Použití méně než 6 zdrojů pro blanky je možno v případě neobvyklé matrice. Normální absence interferujících látek je akceptovatelná v případě, že je odpověď nižší než 20% LLOQ pro analyt a 5% pro interní standard. [5]

4.2.1.2. Přenos

Carry over neboli přenos v průběhu analýzy by měl být objeven a minimalizován v průběhu vývoje dané metody. Přenos je možné eliminovat tím, že po analýze vzorku s vysokou koncentrací nebo po analýze kalibračního standardu na úrovni UQL je

následně analyzován blank vzorku. Přenos na blank vzorku by neměl být vyšší než 20% LLOQ a 5% interního standardu.[5]

4.2.1.3. LLOQ

LLOQ neboli spodní limit kvantifikace je nejnižší množství analytu, které můžeme spolehlivě kvantifikovat s přijatelnou přesností a správností. LLOQ by měla odpovídat nejnižšímu kalibračnímu stupni. Hodnota signálu LLOQ by měla odpovídat pěti násobku signálu blanku. [5]

4.2.1.4. Kalibrační závislost

Kalibrační závislost je definovaná jako závislost vyjadřující vztah mezi odezvou detektoru na koncentraci analytu. Kalibrační standardy by měly být připraveny ve stejné matici jako analyzovaný vzorek. Kalibrační závislost by měla pokrýt oblast koncentrací, ve kterých očekáváme koncentrace zkoumaných analytů. Kalibrační rozsah je ohraničen LLOQ a ULQ, který odpovídá nejvyššímu kalibračnímu standardu. Kalibrační závislost je složena minimálně ze šesti kalibračních standardů, blanku a nulového vzorku. Nulový vzorek je vzorek obsahující biologickou matici a interní standard, ale ne analyt. Analýza probíhá vždy souběžně dvakrát. Nulový vzorek a blank se neberou v úvahu při konstrukci kalibrační závislosti. Pro zpětný výpočet koncentrace z kalibrační závislosti je nutné, aby koncentrace standardu odpovídala $\pm 15\%$ jejich nominální hodnoty mimo hodnotu LLOQ kde je hranice $\pm 20\%$. Toto kritérium musí splňovat alespoň 75% z minimálně šesti kalibračních standardů. [5]

4.2.1.5. Správnost

Správnost bioanalytické metody je definovaná jako blízkost hodnot získaných pomocí metody určené k validaci a nominálních koncentrací analytu. Správnost by měla být hodnocena na vzorcích s přidavkem známého množství analytu nebo QC vzorku. EMA návod definuje správnost dvěma způsoby jako: [5]

- Správnost v sérii – série je složena minimálně z 5 vzorků na jednu koncentrační úroveň. Minimálně se testují 4 koncentrační úrovně
- Správnost mezi sériemi – je testována jako tři kola analýzy opakované v průběhu minimálně dvou dní. Průměrná koncentrace musí odpovídat minimálně 15% nominální hodnoty pro QC vzorky a 20% z nominální hodnoty pro LLOQ.

4.2.1.6. Přesnost

Přesnost bioanalytické metody je popisována jako blízkost výsledků získaných z opakovaných měření analytu. Přesnost se vyjadřuje pomocí variačního koeficientu (CV). Přesnost můžeme dále dělit na dva typy: [5]

- Přesnost v sérii – což je měření přesnosti v průběhu měření jednoho souboru vzorků. Tento soubor obsahuje alespoň 5 vzorků na jednu koncentrační úroveň. Variační koeficient by neměl přesáhnout 15% pro QC vzorky a 20% pro LLOQ
- Přesnost mezi jednotlivými sériemi – zahrnuje měření přesnosti v průběhu času. Přesnost je testována jako tři kola analýzy opakované v průběhu minimálně dvou dní. Průměrná hodnota variačního koeficientu by neměla přesáhnout 15% a pro QC vzorky 20%.

4.2.1.7. Integrita ředění

Ředění vzorků nesmí ovlivňovat přesnost a správnost měření. Integrita během ředění musí pokrývat rozsah, v jakém se bude v dané metodě ředit. Integrita během ředění může být otestována také formou částečné validace. Pro průkaz je možné použít také jinou matici, aby bylo prokázáno, že daná matrice nemá na ředění žádný vliv. [5]

4.2.1.8. Matricové efekty

Matricové efekty mohou být objeveny nejčastěji u metod, kde se využívá hmotnostní spektroskopie. Pro průkaz matricových efektů se použije minimálně 6 různých zdrojů blank matrice. Pro každý analyt a interní standart se počítá tzv. matriční faktor (MF)

$$MF = \text{Plocha píku v přítomnosti matrice} / \text{plocha píku bez matrice}$$

Dále může být vypočítán MF normalizovaného interního standardu. Ten dostaneme, když vydělíme MF analytu MF interního standartu. Variační koeficient MF normalizovaného IS vypočítaný z 6 různých maticí by neměl být větší než 15%. [5]

4.2.1.9. Stabilita

Hodnocení stability se dělá proto, abychom se ujistili, že veškeré operace, které se se vzorkem provádějí od odběru vzorku, přes jeho přípravu, vlastní analýzu a následné skladování, nemají vliv na konečné výsledky. K testování stability se používají kontrolní vzorky se známými vlastnostmi. Testování stability zahrnuje několik různých testů: [5]

- Testování stability zásobních a pracovních roztoků a interních standardů
- Testování citlivosti analytu v matrici na cykly rozmrazení a zamrazení - testuje se stálost analytu při několika kolovém cyklu zmrazení a rozmrazení vzorku. Počet cyklů by měl odpovídat počtu cyklů, které budou opakovány při dané metodě měření. Vzorek by měl být pokaždé zamrazen alespoň po dobu 12 hodin, než bude rozmrazen.
- Krátkodobé testování stability při laboratorní teplotě
- Dlouhodobé testování stability při zmrazování – při testování malých molekul se testuje stálost při zamrazení na -20 °C a -70 °C u velkých molekul by se měly testovat všechny teploty, při kterých budou skladovány vzorky v průběhu validované metody.

4.2.2. Částečná validace

Částečná validace se provádí v případě, že dojde jen k malé změně nebo při přesunu validované metody do jiné laboratoře, při změně laboratorního vybavení, změně koncentračního rozsahu kalibrace, při změně objemu vzorku nebo použití jiného antikoagulačního činidla. Veškeré změny oproti původní validované metodě musí být zaznamenány a musí být ověřeno, že tyto změny nebudou mít vliv na kvalitu výsledků. [5]

4.2.3. Cross validace

Cross validace se provádí v případě, že jsou data získána v rámci jiné metody nebo z jiné laboratoře, kde se aplikuje stejná metoda. Výsledky získané z odlišných prostředí se musí porovnat. [5]

4.2.4. Analýza vlastních vzorků

Aby bylo možné akceptovat výsledky vzorků, je nutné, aby při zpětnému výpočtu hodnoty koncentrace kalibračních standardů byl jejich výsledek maximálně v rozmezí 20% jejich nominální hodnoty, až na hodnotu LLOQ, zde je možné aby byl rozsah až 25% nominální hodnoty. Minimálně 75% kalibračních standardů, kterých je minimálně 6, musí splňovat tuto podmínku. Pro QC vzorky platí další podmínky. QC vzorky musí odpovídat minimálně 3 hladinám koncentrací a musí se provádět souběžně dvakrát. Minimálně 67% z výsledků a 50% výsledků pro každou hladinu musí být v rozsahu $\pm 20\%$ jejich nominální hodnoty. [5]

4.2.5. Dokumentace

Validační dokumentaci můžeme rozdělit na validační zprávu a analytickou zprávu. Validační zpráva obsahuje informace a odkazy na SOP. Všechna dostupná data musí být dostupná v jejich originálním formátu. Jakýkoli odklon od dříve naplánovaného validačního postupu je třeba zdokumentovat a řádně vysvětlit. Součástí validačního reportu jsou všechny informace o referenčních materiálech, kalibračních křivkách. Informace o kritériích, které umožňují přijmout výsledek jako správný. Další součástí jsou tabulky dokumentující kalibraci, analýzu QC vzorků, stabilitní studie a data popisující carry over nebo matricové efekty atd.

Analytický report obsahuje informace a odkazy na validační report, který je aplikován na vlastní analýzu vzorku. Stejně jako u validačního reportu i zde musí být všechny data dostupná v původním originálním formátu. Obsah analytického reportu je stejný jako toho validačního. Podstatný rozdíl je ten, že u bioekvivalenčních studií jsou součástí analytické zprávy ještě chromatogramy z jednotlivých analýz. Množství těchto chromatogramů musí odpovídat minimálně 20% všech analyzovaných vzorků. Do toho souboru jsou zahrnuty i QC vzorky a kalibrační standardy. [5]

5. Validace bioanalytických metod z pohledu Food and drug administration (FDA)

5.1. Historie FDA

Food and drug administration (FDA) je úřad pro kontrolu potravin a léčiv spadající pod americkou vládu. Počátky této organizace můžeme vystopovat již kolem roku 1848, kdy se jednalo pouze o zemědělskou divizi na patentovém úřadě. Jako oficiální počátek FDA lze považovat rok 1906, kdy bylo vydáno exekutivní nařízení Food and Drug Act of 1906. Toto nařízení zakazovalo přetiketování a falšování potravin, které přecházely díky zahraničnímu obchodu. [22]

Ke zlomu došlo roku 1937, kdy nevyzkoušený farmaceutický prostředek zabil velké množství pacientů, včetně mnoha dětí, ihned po tom co byl uveden na trh. Právní úprava z roku 1938 Food, Drug and Cosmetic Act (FD & C) zpřísnila kontrolu a dohled nad výrobou potravin, léčiv a kosmetiky a usnadnila prosazování zákona v této oblasti. Tato právní úprava je ve znění pozdějších předpisů platná dodnes. FDA jako státní organizace vydává celou řadu zákonů, právních předpisů a různých doporučení (FDA Act, FDA regulations and FDA Guidance). Rozdíl mezi FDA Act, FDA regulations and FDA Guidance je následující: [23]

- *FDA Act*: je federální zákon přijatý Kongresem, který stanovuje právní rámec, v němž FDA podniká. Tento zákon (FD & C) lze nalézt v zákoníku Spojených států, který obsahuje všechny všeobecné a trvalé zákony Spojených států amerických, počínaje 21. U.S.C. 301
- *FDA regulations*: FDA vyvíjí předpisy na základě právních předpisů uvedených v zákoně FD & C, podle nichž FDA působí. Obvykle se jedná o proces známý jako "oznámení a komentář ke tvorbě pravidel", která umožňuje veřejný přístup k navrhovanému nařízení, před tím, než FDA vydá konečnou úpravu tohoto nařízení. Předpisy FDA jsou také součástí federálních zákonů, ale nejsou součástí zákona FD & C. Předpisy FDA lze nalézt v hlavě 21 Code of Federal Regulations (CFR).
- *FDA Guidance*: Z právních nařízení vyplývají požadavky, pro uplatnění těchto nařízení v praxi. Jsou to tedy takové návody nebo doporučení pro "dobré vedení praxe" což odpovídá současnému názoru agentury na regulační záležitosti. Pokyny nejsou právně závazné. The Good Practice Guidance regulace lze nalézt v hlavě 21 CFR 10.115.

Z pohledu validace bioanalytických metod je pro nás nejvýznamnější Guidance for industry – Bioanalytical method validation. Tento návod je určen hlavně pro bioanalytické aplikace v oblasti chromatografických metod, imunoanalytických, mikrobiologických metod a metod vázajících ligand (LBAs), které jsou určeny pro kvantitativní stanovení léčiv a jejich metabolitů nebo terapeutických proteinů v biologické matrici, jako je krev, sérum, plasma, moč, tkáň nebo kůže. V oblasti chromatografie se jedná hlavně o aplikace s využitím plynové chromatografie (GC), kapalinové chromatografie (HPLC) a kombinace plynové a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS, LC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS). Jak již bylo řečeno, Guidance je pouze doporučení pro validaci bioanalytických metod, ale tato doporučení mohou být modifikována v závislosti na specifickém typu bioanalytické metody. [6]

5.2. Validační parametry dle FDA

Validace bioanalytické metody zahrnuje celou řadu kroků, které mají ukázat, že je daná metoda použitelná pro kvantitativní hodnocení analytu v biologické matrici, je prakticky proveditelná a reprodukovatelná. FDA definuje parametry, které musí metoda splnit, aby se dala považovat za validní:

- 1) Správnost
- 2) Přesnost
- 3) Selektivita
- 4) Citlivost
- 5) Reprodukovatelnost
- 6) Robustnost

Validace bioanalytické metody zahrnuje také vedení dokumentace v průběhu celé validace. Tato dokumentace slouží jako průkaz pro to, že je tato metoda vhodná k dalšímu použití. Změny oproti doporučenému validačnímu postupu je možné provádět, ale tyto změny je třeba diskutovat a dokumentovat na základě provedení vhodných studií, které prokážou, že tyto změny jsou pro danou metodu a pro daný analyt přínosné. Z pohledu FDA guidance lze validace rozdělit do tří základních kategorií: [6]

- a) Validace celková – tato validace zahrnuje celý proces bez výjimek, nejčastěji se uplatňuje při vývoji nové bioanalytické metody, při analýze nějakého nového léčiva, pro validaci existující metody, kde přidáváme kvantitativní hodnocení nového metabolitu
- b) Částečná validace – se provádí při modifikaci již existující metody. Typickým příkladem je změna v hemokaugulačním činidle při odběru, změna biologické matrice, změna detekčního systému, změna instrumentace atd. Jedná se tedy o změny v rámci již existující a zavedené metody.
- c) Cross-validace - je porovnání validačních parametrů, kdy dvě nebo více bioanalytických metod poskytuje výsledky a vychází ze stejných návodů. Typickým příkladem je porovnání výsledků získaných z referenční metody a z metody komparativní. Nebo také když jsou k získávání výsledků použity různé instrumentace př. LC/MS a ELISA

Analytické laboratoře, kde probíhá validace, musí mít v rámci dokumentace sepsané tzv. standardní operační postupy (SOP). Tyto SOP obsahují přesné návody, které dokumentují celý postup analýzy od příjmu vzorku, přes jeho skladování, preanalytickou část, analytickou část, zpracování výsledků a zajištění kontroly kvality. Dále obsahuje informace o reagentech, validaci laboratorních přístrojů a laboratorní softwaru. [6]

Při kalibraci bioanalytických metod se nejčastěji používají standardní kalibrační vzorky a vzorky pro kontrolu kvality, které jsou spikovány spolu s referenčními standardy. Referenční standardy jsou látky, u kterých je známá čistota a struktura. Tím pádem je u nich i jasně známá koncentrace pro roztoky, které jsou z těchto standardů připraveny. Pokud je to možné, je dobré, aby byl referenční standard stejný nebo aspoň podobný struktuře analytu. Pokud to není možné je povolenou použít jako referenční standard látku, která se vyskytuje ve formě báze, kyseliny či esteru daného analytu o známé čistotě. Referenčních materiálů existuje několik základních variant:

- Certifikované referenční standardy – pouze z certifikovaných laboratoří
- Komerčně dodávané standardy z prověřeného zdroje
- Ostatní referenční materiály, které mají zdokumentovanou čistotu

V rámci procesu validace je třeba projít několika základními kroky a ukázat, že je daná metoda vhodná pro daný účel. V rámci použitých technik se mohou některé detaily lišit, ale vždy máme několik základních parametrů, které je třeba sledovat. [6]

5.2.1. Selektivita

je schopnost bioanalytické metody rozlišit a kvantifikovat analyt v přítomnosti ostatních komponentů ve vzorku. V průběhu validace je třeba ověřit, že námi sledovaný eluent je skutečně požadovaný analyt. V průběhu testování se sleduje vliv interferencí, které mohou pocházet z vlastní matrice, z vnějšího prostředí či se může jednat o metabolity léčiv, které daný pacient užívá. Může také nastat situace, kdy interference je látka, která je fyziologická a po chemické stránce totožná a námi

sledovaným analytem. Při využití ligandu je třeba porovnat výsledky ještě s jinou validovanou referenční metodou např. LC-MS.

Součástí testování selektivity metody je testování blanku. Sleduje se, zda se interference, která se objevila v průběhu testování vzorku, objevuje také v blanku. Blanky biologické matrice musí pocházet nejméně šesti různých zdrojů. Selektivita by měla být měřena na úrovni koncentrace, která odpovídá LLOQ. V případě, že je daná metoda využívána pro stanovení více než jednoho analytu, je třeba zajistit testování každého z nich a ujištění se, že se jedná o správný analyt [6]

5.2.2. Správnost, přesnost a výtěžnost

- a) správnost bioanalytické metody ukazuje blízkost mezi výsledky pro jednu určitou koncentraci. Přesnost se určuje na základě opakovaných měření vzorku s přesně známým množstvím analytu- jedná se o vzorky pro kontrolu kvality. Přesnost by měla být měřena v rozsahu minimálně pěti koncentračních stupňů. Minimálně tři z těchto pěti vzorků by se měly pohybovat v rozmezí, ve kterém očekáváme výsledky naší metody. Průměrná hodnota by se měla pohybovat v rozptylu $\pm 15\%$ nominální hodnoty. Z tohoto rozmezí je vyjmuta hodnota LLOQ, kde je povolen rozptyl nepřesahující $\pm 20\%$. U metod vázajících ligand je rozptyl výsledků jak pro průměrnou hodnotu, tak pro hodnotu LLOQ o 5% vyšší.
- b) Přesnost bioanalytické metody je popisována jako blízkost jednotlivých měření analytu. Tento analyt byl měřen ve vzorcích, které vznikly přidáním analytu do známého homogenního objemu biologické matrice. Přesnost by měla být měřena pro minimálně pět různých koncentrací a minimálně tři z těchto koncentrací by se měly pohybovat v rozsahu, kde očekáváme naše výsledky. Přesnost pro každou koncentraci by neměla přesáhnout 15% RSD. Z tohoto rozmezí byla vyjmuta hodnota LLOQ, tato hodnota by neměla být vyšší než 20% RSD. Stejně jako u přesnosti i zde jsou hodnoty pro metody využívající ligand pro každou koncentraci i hodnotu LLOQ o 5% vyšší. Preciznost můžeme dále dělit na dva typy:
- Preciznost v sérii – což je měření preciznosti v průběhu měření jednoho souboru vzorků
 - Preciznost mezi jednotlivými sériemi – zahrnuje měření preciznosti v průběhu času. Toto měření zahrnuje využití různých osob, které analýzu provádějí,

různých laboratorních přístrojů, chemikálií nebo preciznost mezi jednotlivými laboratořemi. Pokud jsou do testování zahrnuty i roztoky jejichž koncentrace je nad horní limit kvantifikace (ULOQ) je zapotřebí tyto roztoky naředit a znova zvalidovat.

- c) Výťažnost analytické metody zjistíme jako porovnání odpovědi detektoru na dva různé vzorky. První vzorek byl získán tak, že jsme do biologické matrice přidali známé množství analytu a tento analyt jsme následně z biologické matrice extrahovali. Extrakce probíhala podle definovaných postupů, které jsou popsány v SOP. Druhý vzorek jsme získali rozpuštěním analytu ve známém rozpouštědle bez extrakčního postupu. Výťažnost analytické metody nemusí být 100%, ale je nutné, aby výťažnost analytu a interního standardu (IS) byla stejná a reprodukovatelná. Výťažnost by měla být testována jako porovnání výsledků, získaných z extrakcí tří různých koncentrací (nízká, střední, vysoká) s výsledky z neextrahovaných vzorků, které reprezentují 100%. U metod využívajících vazbu ligandu spolu s extrakčním postupem se výťažnost testuje jako porovnání množství, které jsme získali z extrakce a známé množství, které bylo přidáno před extrakcí. Extrakce by měla být provedena u tří různých koncentrací. [6]

5.2.3. Kalibrační křivka

vyjadřuje závislost mezi odpovědi instrumentu na známou koncentraci analytu. Tato závislost by měla být kontinuální a reprodukovatelná. Kalibrační křivka by měla být připravena pro každý jednotlivý analyt obsažený ve vzorku. Kalibrační křivka je složena z odpovědi na blank vzorku, nulového vzorku (což je vzorek obsahující biologickou matrici a interní standard, ale ne analyt) a dalších šesti nenulových vzorků, které pokryjí rozmezí námi očekávaných koncentrací. Proces validace zahrnuje měření v průběhu několika dní se čtyřmi různými koncentracemi zahrnující úroveň LLOQ, nízké, střední a vysoké koncentrace měřené v duplikátu při každé analýze.

Součástí kalibrační křivky je také určení LLOQ a ULOQ. Pro každý tento limit platí vlastní kritéria, která musí splňovat, aby mohl být prohlášen za platný. Součástí procesu kalibrace je také zařazení tzv. kontrolních vzorků – Quality control sample (QCs). U QCs máme předem známou, a ve většině případů od výrobce potvrzenou,

koncentraci analytu. Počet kontrolních vzorků by měl být minimálně na úrovni 5% počtu testovaných neznámých vzorků, anebo šesti celkových QCs. Kontrolní vzorky by měly být rovnoměrně rozděleny do kalibrační oblasti v nízkých, středních a vysokých koncentracích. QCs nám umožňují ověření, že naše metoda funguje správně a že námi vydávané výsledky můžeme považovat za pravdivé. U metod vázajících ligand ve většině případů nemá kalibrační přímka lineární průběh a závislost není homogenní. Z tohoto důvodu by u těchto metod měl být kalibrační křivka složena z šesti duplikátů nenulových kalibračních standardů zahrnujících celou oblast studovaných koncentrací včetně LLOQ, ale bez blanku. [6]

5.2.4. Citlivost

je definovaná jako nejnižší koncentraci analytu (srovnatelné s LLOQ), kterou jsme schopni určit s přijatelnou mírou přesnosti a správnosti. [6]

5.2.5. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost metody je hodnocena na základě opakovaných analýz, které zahrnují analýzu QCs a obyčejných vzorků. A hodnotí se míra shody mezi těmito výsledky. Dále možno testovat reprodukovatelnost metody pro opakovaný nástrík vzorku např. u chromatografických metod, kdy došlo k přerušení analýzy. [6]

5.2.6. Stabilita

stabilitou je v tomto případě myšlena hlavně stálost daného analytu. Tuto stálost můžeme posuzovat z několika různých hledisek:

- Stabilita z chemického pohledu – tím je myšlena stabilita analytu umístěného do specifické matrice za specifických podmínek. V předem určených časových intervalech se odebírají vzorky a zkoumá se, jestli zde nedochází k nějaké chemické přeměně daného analytu. Tyto studie se mohou dále zaměřovat na změnu chemické stability v souvislosti s odběrem a následných uskladněním analytu
- Stabilita z pohledu stability léčiva- kdy analytem je nějaké léčivo, které je součástí biologické matrice. Stabilita těchto léčiv je dána hlavně skladovacími

podmínkami a odběrovým systémem, který jsme pro odběr vzorku použili. Takto získané informace o stabilitě ovšem nelze použít obecně, ale vždy je třeba je extrapolovat

- Testování stability z pohledu analytického procesu. Tyto studie testují stabilitu analytu v průběhu odběru vzorku a následného skladování a to jak krátkodobě, tak dlouhodobě. Podmínky by měly odpovídat těm, které budou panovat při metodě, kterou validujeme. Testování stability analytického procesu patří k těm nejdůležitějším a zahrnuje následující procesy:
 - a) Stabilita při zmrazení – testuje se stálost analytu při několikakolovém cyklu zmrazení a rozmrazení vzorku. Mělo by se jednat minimálně o tři cykly
 - b) Stabilita měřících podmínek- tato studie by měla být zaměřena na pokrytí podmínek, které budou panovat v průběhu měření vzorku
 - c) Dlouhodobé studie stability- skladování a stabilita vzorku by se měly rovnat nebo přesáhnout čas mezi datem prvního sběru vzorku a datem poslední analýzy tohoto vzorku
 - d) Stabilita zásobního roztoku – testuje se po jak dlouhou dobu je analyt, v zásobním roztoku stálý, tedy po jak dlouhé době zásobní roztok udrží koncentrací analytu beze změny. Pokud je zásobní roztok analytu připraven v různých prostředích či různých stavech, které se liší oproti referenčnímu materiálu je potřeba tyto data ověřit
 - e) Stabilita v průběhu analýzy - kontrola stability při dávkování pomocí autosampleru

U metod vázajících ligand máme několik klíčových reagensů, jako jsou značené reagensy tzv. tracers – což jsou reagensy, které na sobě mají nějakou značku, která usnadňuje jejich detekci. U takových reagensů je nutné optimalizovat a prozkoumat proces vazby značky na příslušný analyt. Tato optimalizace je potřebná, pro jistotu, že vazba probíhá skutečně na námi zvolený analyt a nedochází k vazbě na matici nebo na jiný analyt přítomný ve vzorku. U některých analýz se používají také protilátky. Zde je třeba zkontrolovat tzv. zkříženou reaktivitu protilátek což je stav, kdy námi zvolená protilátka reaguje s více antigeny a tím pádem by naše reakce byla nespecifická a nereagoval by pouze námi zvolený analyt. [11]

Součástí FDA guidu je také doporučení ohledně vedení dokumentace. Jak již bylo zmíněno, veškeré postupy zahrnující práci se vzorkem a jeho zpracování by měly být zahrnuty ve standardních operačních postupech. Další součástí dokumentace by měly být také zprávy z jednotlivých kontrol kvality dále zprávy z průběhu vývoje metody a její následné validace a dokumenty popisující úskalí a limity dané metody. Stejně tak, by měly být dohledatelné veškeré výsledky získané na přístroji, tzn. je potřeba provádět zálohování výsledků. Tyto výsledky by měly obsahovat informace o tom, jaký analyt byl stanovován, kdy začala a kdy skončila analýza, tzv. holá data před integrací, data po integraci a další operace, které byly provedeny pro získání výsledku analýzy. [6]

6. Srovnání validačních parametrů dle FDA Guidance a EMA Guideline

První, kdo přišel s nějakými pravidly pro bioanalytické metody, byla americká FDA, která vydala svůj Guidance v roce 2001. EMA se k nastavení nějakých pravidel, přidala až v roce 2009. Oba dokumenty jsou členěny do stejných částí a diskutují ve většině případů stejné problémy. [14,16]

První částí je úvod, kde obě agentury seznamují uživatele s tím co je obsahem bioanalytických metod. Jedním z hlavních bodů, ve kterých se obě doporučení v samotném úvodu liší, je to, že EMA doporučuje, aby validace každé bioanalytické metody byla brána případ od případu a jednotlivé validační parametry byly vždy přesně určeny pro daný účel. FDA se k tomuto doporučení nevyjadřuje.

Druhá část obsahuje informace o právním podkladu jednotlivých doporučení. EMA Guideline řeší shodu mezi statusem bioanalytické metody a definuje rozdíly mezi preklinickou a klinickou studií. V rámci této části je nastíněno, že validace bioanalytické metody a následná analýza vzorku by měla být provedena podle zásad správné laboratorní praxe (SLP), ačkoli lidské bioanalytické studie nespádají do oblasti, kde by se zásady SLP uplatňovaly. Bioanalytické a následně klinické studie by měly patřit do zásad správné klinické praxe (GCP). EMA doporučuje, aby validace bioanalytické metody byla provedena pouze v laboratoři, která pracuje v režimu SLP. FDA nemá tyto požadavky upřesněny, protože se odkazuje na konkrétní zákony, které

tyto požadavky upravují. Laboratoře, které provádějí farmakologické nebo toxikologické studie by se měly řídit SLP zakotvenou v nařízení o SLP - Good Laboratory Practices (GLPs), kterou najdeme v 21 CFR 135 část 58. Laboratoře provádějící bioekvivalenční, farmakokinetické studie či studie biodostupnosti na lidech se musejí řídit nařízením, které je umístěno v 21 CFR 320.29.

Třetí části jsou věnovány jednotlivým validačním parametrům. Na začátku těchto částí jsou rozebírány požadavky pro celkové, částečné, cross validace a požadavky na referenční materiály. U obecných požadavků na celkové validace se obě agentury poměrně shodují. Rozdílné názory se ukazují v částech věnovaným částečným validacím. FDA doporučuje, aby se částečná validace prováděla jen v případě, že dojde ke změně druhu matrice používané v bionalytické studii a částečná validace se tedy musí provést pro nový druh matrice. EMA je v tomto nařízení přísnější a říká, že se musí provést celková validace pro všechny druhy maticí. Ohledně referenčních materiálů, jejich využití a zdrojů, ze kterých se získávají, se oba dokumenty vyjadřují nastejno. EMA bere ovšem doporučení vážněji a uvádí další informace o ověření vhodnosti daného referenčního materiálu pro daný účel. Uvádí speciální doporučení pro metody využívající MS detekci. Tyto metody by jako referenční materiály měly využívat materiály, které mají radioaktivní značení. Stejně tak, by u těchto materiálů mělo být zdokumentováno a zajištěno, že nedojde k isotopové výměně mezi značeným materiálem a neznačeným analytem v matici. Měly by se využívat materiály o nejvyšší možné čistotě a to z toho důvodu, aby se minimalizovalo riziko vzniku interferencí mezi měřeným analytem a neznačeným interním standardem. [7,16]

6.1. Selektivita

V této části se diskutuje konverze nestabilního metabolitu, na sledovaný analyt. FDA se k tomuto problému nevyjadřuje, ale EMA doporučuje spikovat blank matrice metabolitem o různě vysokých *in vivo* koncentracích. Spikované kontroly jsou pak podrobeny extrakčnímu postupu a je sledována jestli nedochází ke zpětné konverzi.

6.2. Carry over

V tomto bodu se obě agentury shodují. EMA jde ovšem trošku dále a doporučuje, aby u chromatografických metod, pro minimalizaci carry overu, nedocházelo k náhodnému dávkování vzorku.

6.3. LLOQ a kalibrační křivka

Obě agentury používají odlišnou terminologii, ale obě mají stejný kontext. FDA doporučuje, aby kalibrační závislost odpovídala pravděpodobnému rozsahu, ve kterém se bude studie pohybovat. EMA ohledně LLOQ doporučuje, aby byla tato hranice nastavena na hodnotu, která je očekávaná ve vzorku. Ohledně přijmutí kalibrační křivky mají obě agentury shodný názor.

6.4. Správnost a přesnost metody

V této části byly hlavní rozdíly v názoru na umístění QC vzorku pro horní část kalibrační křivky. EMA doporučuje, aby byla tato hladina umístěna v 75% hodnoty ULOQ, což je ovšem poměrně nízká hodnota pro ověření přesnosti a správnosti měření v horní části kalibrační závislosti. FDA je v této oblasti méně specifická a pouze říká, že by bylo dobré QC vzorky umístit do blízkosti hodnot v horní části kalibrační závislosti. U chromatografických metod doporučuje aby hodnoty přesnosti a správnosti pro QC vzorky odpovídaly 85% ULOQ.

6.5. Stabilita

EMA doporučuje aby stabilitní studie byly provedeny v každém kroku validačního procesu, tzn. stabilní průběh v průběhu preanalytické fáze, analýzy vlastního vzorku a následného skladování.

6.6. Cross validace

Zde panují poměrně velké rozdíly v chápání co to cross validace vlastně je. FDA chápe cross validaci jako porovnání validačních parametrů získaných ze dvou nebo více bioanalytických metod využitých pro jednu studii nebo napříč studiemi. Toto chápání zahrnuje situaci, kdy je jeden vzorek analyzován na více místech. EMA cross validaci definuje jako vyžadované porovnání analytických metod, které byly použity pro měření

daného analytu na různých místech. Doporučuje aby cross validace byla provedena před vlastní analýzou vzorku. Kritérium, které povoluje přijetí této validace je 15% rozdíl mezi daty získanými mezi dvěma metodami.

Čtvrtá část se věnuje analýze vlastních vzorků. EMA návod říká, že pokud mezi validací metody a analýzou vzorků uběhla delší doba, je potřeba ověřit, že validace stále poskytuje správné výsledky. Jedinou chybou v tomto ustanovení je to, že Guideline neuvádí, jak dlouhý je časový úsek po kterém je třeba validaci ověřit. FDA tento problém neřeší. Guideline definuje obsah jednoho souboru měření (batch). Každý soubor by měl obsahovat blank matrice, nulový vzorek, kalibrační standardy, QCs a vlastní vzorky. Každá batch, by měla být měřena jako jeden celek a v průběhu měření by bylo dobré se vyhnout rozdělení vzorků do několika souborů. V této části je také diskutován problém s opakovaným měřením vzorků. Guideline uvádí, že opakovaná analýza chybného vzorku není možná, pokud chyba vznikla na základě farmakokinetického problému. Stejně tak není možné analýzu opakovat, pokud došlo k chybě při kalibraci nebo došlo k chybě při analýze QC vzorků [16]

Poslední část se věnuje dokumentaci, která musí být vedena v průběhu celého validačního procesu. Obě agentury mají poměrně podrobný popis všech dokumentů, které by měly jasně dokumentovat celý validační proces. EMA Guideline ovšem uvádí některé věci navíc oproti FDA Guidance. Konkrétně dává návody pro dokumenty týkající se validaci metody. Zde uvádí, že součástí zprávy má být protokol obsahující informace o celé studii a SOP. Veškerá individuální data by měla být dostupná v elektronické podobě. Stejně tak by měla obsahovat veškeré informace o kalibračních standardech a QC vzorcích a skladovacích podmínkách. Ohledně návodu pro analýzu vzorku zde uvádí, že zpráva by měla obsahovat chromatogramy z 5-20 % všech vzorků, které byly analyzovány. FDA se o dokumentaci také zmiňuje, ale vždy jako poznámka na konci každé kapitoly, nevěnuje ji samostatný oddíl jako EMA. Veškeré rozdíly mezi jednotlivými agenturami jsou přehledně shrnuty do tabulky č. 4.

Tabulka č. 4 – Porovnání obsahu EMA guideline a FDA guidance			
Sekce		EMA guideline	FDA guidance
1. Část 2. Část		Popisuje validace a analýzu vzorku obecně. Validace metody i vlastní analýza by měla být provedena podle zásad SLP a SKP	Zahrnuje i popis vývoje metody. Zmiňuje se i o preklinických studiích a jejich návaznost na zásady SLP
3. Část – jednotlivé validační požadavky	obecné	Pro MS detekci doporučuje používat radioaktivně značené standardy.	nezmiňuje
	Selektivita	Požaduje validaci pro každý druh matrice. Výtěžnost nebere jako důležitý parametr.	Přestavuje koncept částečné validace. Výtěžnost bere jako jeden z validačních parametrů.
	Carry over	Carry-over by měl být <20% pro analyt a <5% pro IS.	nezmiňuje
	LLOQ	Přidává kritérium pro LLOQ v BE studiích (5% C _{max.})	nezmiňuje
	Kalibrační křivka	Pro kalibrační závislost by měl být použit nejjednodušší vztah popisující odezvu přístroje na koncentraci analytu.	Detailnější popis modelu – využití nejjednoduššího modelu
	Přesnost a správnost	Přesnost v sérii by měla být měřena „na jeden záta“ nejméně pět vzorků na úrovni minimálně čtyř úrovní koncentrace, které pokrývají rozsah kalibrační křivky.	Minimální počet koncentrací jsou tři.
		Hlášení z validace metod a ze stanovení přesnosti a správnosti by měly zahrnovat všechny výsledky získané v průběhu validace s výjimkou těch případů, kdy jsou jasné a zdokumentované chyby	Výpočty přesnosti a preciznosti se provádí se všemi hodnotami s výjimkou hodnot, které jsou statisticky stanovené jako odlehlé.
4. Část – analýza vzorku			

5. Část – dokumentace	Tabulka výsledků kalibračních standardů povolených běhů	Tabulka výsledků kalibračních standardů všech běhů
	Údaje o selektivitě, LLOQ a integritě ředění	nezmiňuje
	Neočekávané výsledky s plným odůvodněním a opatřením	nezmiňuje
	Opakovaná analýza vzorku, vyloučit reassay kvůli analytickému důvodu, jako je selhání spuštění	Vyžaduje reassay SOP jako dodatek
	Chromatogramy: neurčeno	Chromatogram: jen nějaké ukázky
	BE studie: všechny chromatogramy z běhů, které obsahují 20% subjektů (včetně norem a QC) Jiné studie - Reprezentativní chromatogramy pouze	Chromatogramy, které mají být předloženy: 5-20% pro ANDA a zástupce pro NDA
<p><i>ANDA: Abbreviated New Drug Application; BE: Bioequivalence; IS: Internal standard; ISR: Incurred sample reanalysis; LBA: Ligand binding assays; MRD: Minimum required dilution; NA: Not addressed; NDA: New Drug Applicatio.</i></p>		

7. Závěr

V předložené bakalářské práci byly srovnány základní validační parametry, které vycházely z požadavků dvou významných světových agentur, které mají hlavní slovo při nastavování pravidel pro validaci bioanalytických metod. Nejvýznamnější agenturou v USA je Food and drug administration (FDA), což je úřad pro kontrolu potravin a léčiv. V Evropské unii je nejvýznamnější agenturou European medicines agency (EMA), což je Evropská léková agentura.

Z pohledu legislativních požadavků to mají obě agentury nastaveny odlišně. FDA je součástí federálního vládního systému USA. Jako federální úřad vydává celou řadu federálních zákonů, které jsou závazné pro celou USA. Základní právní předpis, kterým byl ustanoven právní rámec, ve kterém FDA působí, je zákon z roku 1938 Food, Drug and Cosmetic Act (FD & C), který platí až dodnes. Je zakotven v zákoníku Spojených států, který obsahuje všechny všeobecné a trvalé zákony Spojených států amerických, počínaje 21. U.S.C. 301. Další právní předpisy, které FDA vydává, jsou legislativně začleněny v hlavě 21 Code of Federal Regulations. Tyto druhy právních předpisů jsou právně závazné a FDA je může vymáhat právní cestou. Dalším stupněm jsou tzv. FDA Guidance což jsou právně nezávazné návody a doporučení jak dané předpisy uvádět do praxe.

EMA je na rozdíl od FDA nevládní agentura a slouží spíše, jako poradní orgán Evropské unie tzn., že agentura sama o sobě nemůže vydávat žádné právně závazné dokumenty. Agentura pouze může vypracovat doporučení nebo podklady pro uplatňování právních předpisů Evropské unie. V oblasti validace bioanalytických metod vydala EMA doporučení, které navazuje na základní principy, které jsou uvedeny v části I a II přílohy I směrnice 2001/83 ve znění pozdějších předpisů, a nařízení (ES) č. 726/2004.

Základní validační parametry mají obě agentury nastaveny podobně. Mezi základní parametry, které řeší obě agentury, patří selektivita, carry over, LLOQ a nastavení kalibrační křivky, správnost a přesnost metody, stabilita systému a cross validace.

Selektivita je podrobně řešena hlavně v návodu od EMA, která zde diskutuje problém s konverzí nestabilního metabolitu. FDA se k tomuto problému nevyjadřuje.

Na Carry over mají obě agentury stejný názor. EMA ovšem svoje doporučení rozšiřuje pro chromatografické metody. Ohledně LLOQ a nastavení kritérií pro kalibrační křivky mají obě agentury podobný názor. Obě agentury se liší v používané terminologii, ale mají ve svém důsledku stejný význam. Agentury se liší v nastavení rozsahu kalibračních závislostí. FDA předpokládá, že kalibrační studie budou nastaveny v celém očekávaném rozsahu výskytu vzorku ve studii. EMA předpokládá, že kalibrační závislost se bude pohybovat v rozmezí, kde očekáváme výsledek u pacientů. U přesnosti a správnosti metody obě agentury používají QC vzorky a liší se v názoru do jaké hladiny je třeba tyto vzorky umístit, aby byla zajištěna správnost a přesnost kalibrační závislosti v její horní části. EMA doporučuje, aby byla tato hladina umístěna v 75% hodnoty ULOQ, FDA je v této oblasti méně specifická a pouze říká, že by bylo dobré QC vzorky umístit do blízkosti hodnot v horní části kalibrační závislosti. U chromatografických metod doporučuje aby hodnoty přesnosti a správnosti pro QC vzorky odpovídali 85% ULOQ. Ohledně stabilitních studií, zde mají obě agentury stejný názor. Obě agentury doporučují, aby byla stabilita sledována ve všech krocích validačního procesu a to od odběru vzorku, přes jeho zpracování, vlastní analýzu a následné skladování. Stejně tak doporučují, aby byla sledována stabilita zásobních roztoku, kalibračních standardů a referenčních materiálů. Kde se obě agentury rozcházejí je pojem cross validace. FDA chápe cross validaci jako porovnání validačních parametrů získaných ze dvou nebo více bioanalytických metod využitých pro jenu studii nebo napříč studiemi. EMA cross validaci definuje jako vyžadované porovnání analytických metod, které byly použity pro měření daného analytu na různých místech. Doporučuje aby cross validace byla provedena před vlastní analýzou vzorku.

Obě agentury se ve svých doporučeních moc neliší. FDA se ke spoustě problému, které diskutuje EMA, nevyjadřuje, ale tento rozdíl je dán tím, že FDA může tuto oblast regulovat pomocí dalších právních předpisů a proto není nutné, aby ve svém doporučení vše řešila do detailů. EMA díky tomu, že není vládní agenturou, musí svá doporučení jednoznačně a do detailu propracovat a řešit spoustu situací, které nejsou definovány v dalších právních předpisech EU. Porovnávat tedy oba návody je možné pouze po praktické stránce, ale nikoli po stránce právní, protože každý z nich vznikl na jiném právním podkladu.

8. Literatura

- [1] KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., RUML, T. *Bioanalytické metody*. 3rd ed. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008.
- [2] FRIEDECKÝ, B.; ŠPRONGL, L.; KRATOCHVÍLA, J.; PLÁK, Z. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, 2010. ČSKB. http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf (accessed April 17, 23)
- [3] TNI 01 0115. *Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*. Praha, 2009. 90 p.
- [4] ČSN EN ISO 9000. *Systémy managementu kvality. Základy, zásady, slovník*. 2006. 64 p.
- [5] Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation, 2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed April 17, 23)
- [6] Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2013. [www.fda.gov](https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf). <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf> (accessed April 17, 23)
- [7] VAN AMSTERDAM, P., COMPANJEN, A., BRUDNYKLOEPPPEL, M., GOLOB, M., LUEDTKE, S., TIMMERMAN, P. The European Bioanalysis Forum community's evaluation, interpretation and implementation of the European Medicines Agency guideline on Bioanalytical Method Validation. *Bioanalysis*, 2013, vol. 5, no. 6, p. 645–659

- [8] BLUME, H., ERICH, B., BRUDNY-KLÖPPEL, M., GREBE, S., LAUSECKER, B., ROHDE, G., SIETHOFF, Ch. Workshop/Conference Report on EMA Draft Guideline on Validation of Bioanalytical Methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (2011) 300–305, 2011, p. 300–305

- [9] BOOTH, B., ARNOLD, M. E., DESILVA, B., AMARAVADI, L., DUDAL, S., FLUHLER, E., GOROVITS, B., et al. Workshop Report: Crystal City V—Quantitative Bioanalytical Method Validation and Implementation: The 2013 Revised FDA Guidance. *The AAPS Journal*, 2015, vol. 17, no. 2, p. 277–288

- [10] BOWER, J., FAST, D., FABIO, G., GOUTY, D., HAYES, R., LOWES, S., NICHOLSON, R., et al. 8th GCC: Consolidated feedback to US FDA on the 2013 Draft FDA Guidance on Bioanalytical Method Validation. *Bioanalysis*, 2014, vol. 6, no. 22, p. 2957–2963

- [11] Alergie- vysvětlení pojmu. Zdravotnimagazin.cz. <http://zdravotnimagazin.cz/alergie/alergie-vysvetleni-pojmu> (accessed April 17, 23).

- [12] WILLE, S. M. R., PETERS, F. T., DI FAZIO, V., SAMYN, N. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accred Qual Assur*, 2011, vol. 16, p. 279–292.

- [13] HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D., McDOWALL, R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, vol. 17, p. 193–218.

- [14] SHAH, V. P. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *The AAPS Journal*, 2007, vol. 9, no. 1, Article 5.

- [15] TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M., VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, no. 8, p. 535–552
- [16] SMITH, G. Bioanalytical method validation: notable points in the 2009 draft EMA Guideline and differences with the 2001 FDA Guidance. *Bioanalysis*, 2010, vol. 2, no. 5, p. 929–935
- [17] BOWER, J. F., McCLUNG, J. B., WATSON, C., OSUMI, T., PASTRE, K. Recommendations and Best Practices for Reference Standards and Reagents Used in Bioanalytical Method Validation. *The AAPS Journal*, 2014, vol. 16, no. 2, p. 352–356.
- [18] LAXMAN KOLE, P., VENKATESH, G., KOTTECHA, J., SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.*, 2011, vol. 25, p. 199–217
- [19] History of EMA. [www.ema.europa.cz.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000628.jsp&mid=WC0b01ac058087addd](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000628.jsp&mid=WC0b01ac058087addd) (accessed April 17, 23)
- [20] Who we are. [http://www.ema.europa.eu.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000112.jsp&mid=WC0b01ac0580028a43](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000112.jsp&mid=WC0b01ac0580028a43) (accessed April 17, 23)
- [21] Committees, working parties and other groups. [http://www.ema.europa.eu.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000217.jsp&mid=](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000217.jsp&mid=) (accessed April 17, 23)
- [22] The History Of Drug Regulation In the United States. [http://www.fda.gov.
https://www.fda.gov/downloads/aboutfda/whatwedo/history/productregulation/promotingsafeandeffectivedrugsfor100years/ucm114468.pdf](http://www.fda.gov/https://www.fda.gov/downloads/aboutfda/whatwedo/history/productregulation/promotingsafeandeffectivedrugsfor100years/ucm114468.pdf) (accessed April 17, 23).

[23] FDA Rules and Regulations. www.fda.gov.
<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/RulesRegulations/UnifiedAgendaofRegulations/default.htm> (accessed April 17, 24).